

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-5298

(P2000-5298A)

(43) 公開日 平成12年1月11日 (2000.1.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テームコード (参考)
A 61 L 27/00		A 61 L 27/00	M 4 C 0 8 1 U

審査請求 未請求 請求項の数 6 FD (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平10-188295

(22) 出願日 平成10年6月17日 (1998.6.17)

(71) 出願人 591030983

科学技術庁無機材質研究所長

茨城県つくば市並木1丁目1番地

(71) 出願人 000190943

新田ゼラチン株式会社

大阪市浪速区桜川4丁目4番26号

(72) 発明者 田中 順三

茨城県つくば市鹿島台3丁目6番地

(72) 発明者 李 相熙

茨城県つくば市千現2-8-3 セジュール進仲C-101

(74) 代理人 100073461

弁理士 松本 武彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アパタイトコーティング有機材料の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 親水基を有する有機材料の表面に穏和な条件下での処理によりアパタイト層を形成する。

【解決手段】 少なくともリン酸イオンおよびカルシウムイオンを含み、かつ有機酸を含む水溶液に、親水基を有する有機材料を浸漬することで、前記有機材料の表面にアパタイトを析出させる、アパタイトコーティング有機材料の製造方法。

図面代用写真



【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくともリン酸イオンおよびカルシウムイオンを含み、かつ有機酸を含む水溶液に、親水基を有する有機材料を浸漬することで、前記有機材料の表面にアパタイトを析出させる、アパタイトコーティング有機材料の製造方法。

【請求項2】 有機酸が多塩基酸である、請求項1記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

【請求項3】 有機酸がクエン酸である、請求項2記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

【請求項4】 水溶液中の有機酸の量が、水溶液中のカルシウムイオンの全量と錯塩を形成する量よりも少ない量である、請求項1から3のいずれかに記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

【請求項5】 親水基を有する有機材料が少なくともコラーゲンおよび／またはセルロースを含む、請求項1から4のいずれかに記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

【請求項6】 アパタイトが炭酸イオン含有アパタイトである、請求項1から5のいずれかに記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、アパタイトコーティング有機材料の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来生体に植入されている人工材料は、素材の物性が優れているにも関わらず骨伝導能が不十分であったため、骨置換能や組織再建能が低く十分な医療効果をあげることができなかった。骨伝導能の不足を補うには生体骨の構成成分の一つであるアパタイト（ハイドロキシアパタイト）を用いて組成を生体骨と近似させることが望ましいが、基板として用いられる材料の多くはアパタイト形成能を有しないか、有するとしてもその能力は低いという問題がある。この問題を解決するため、イオン注入、プラズマ処理、強アルカリ処理等の表面処理を施して基板表面にアパタイト形成能をもたせることが行われているが、これらの表面処理の条件が過酷であるため利用できる基板材料がチタン金属、ステンレス、バイオガラスおよび一部の高分子等に限られる。そのため、例えばコラーゲンは生体に為害性がなく、入手も容易である点で優れた基板素材であるが、過酷な表面処理を行うとコラーゲン自体が劣化するため、コラーゲンの表面にアパタイト層を形成するためには煩雑な工程が必要とされる。したがって、コラーゲンの表面にアパタイト層を簡便な方法で形成する実用的な方法は未だ見出されていないのが現状である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 したがって、本発明の課題は、コラーゲンやセルロース等の親水基を有する有

機材料の表面に穏和な条件下での処理によりアパタイト層を形成すること、すなわち、アパタイトコーティング有機材料の製造方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 上記課題を解決するため、本発明は、以下の構成を提供する。

(1) 少なくともリン酸イオンおよびカルシウムイオンを含み、かつ有機酸を含む水溶液に、親水基を有する有機材料を浸漬することで、前記有機材料の表面にアパタイトを析出させる、アパタイトコーティング有機材料の製造方法。

【0005】 (2) 有機酸が多塩基酸である、前記(1)記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

(3) 有機酸がクエン酸である、前記(2)記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

(4) 水溶液中の有機酸の量が、水溶液中のカルシウムイオンの全量と錯塩を形成する量よりも少ない量である、前記(1)から(3)のいずれかに記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

【0006】 (5) 親水基を有する有機材料が少なくともコラーゲンおよび／またはセルロースを含む、前記(1)から(4)のいずれかに記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

(6) アパタイトが炭酸イオン含有アパタイトである、前記(1)から(5)のいずれかに記載のアパタイトコーティング有機材料の製造方法。

【0007】

【発明の実施の形態】 本発明は、これまでアパタイトの結晶成長の阻害剤であると信じられてきた有機酸を用いて、逆にアパタイトの形成速度を高めることができた点に最大の特徴がある。すなわち、カルシウムイオンとリン酸イオンとを含む水溶液に、単に親水基を有する有機材料を浸漬しただけではアパタイトの析出は起こらないが、この水溶液中に有機酸を存在させることで、アパタイトの形成速度が高められ析出が始まるのである。その原理は定かではないが、有機酸が解離して生成した陰イオンがカルシウムイオンと複合体を形成し、これがアパタイトイオンの成長核となるものと推測される。さらに、有機酸が解離して生成した陰イオンは有機材料（基板成分）の親水基とも何らかの相互作用を起こし、さらにアパタイトの析出を促進するものと推測される。したがって、有機酸としてはカルボキシル基を2個以上有する多塩基酸が好ましく、例えば、クエン酸、イソクエン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、シュウ酸等を例示することができる。これらは、生体内のいたるところに存在し、クエン酸回路を構成している点において好ましく、特にクエン酸が好ましい。

【0008】 有機酸は従来から信じられてきたようにその使用量によってはアパタイトの形成を阻害する場合もあるため、水溶液中の有機酸の量が、水溶液中のカルシ

ウムイオンの全量と錯塩を形成しうる量よりも少ない量であることが好ましい。すなわち、有機酸が一分子中に n 個のカルボキシル基を有する場合、有機酸の濃度がカルシウムイオン濃度の $3/n$ 倍以下であることが好ましい。より好ましくは $3/2n$ 倍以下である。また、水溶液中の有機酸の濃度としては $0.1 \sim 5 \text{ mM}$ の範囲が好ましく、 $0.3 \sim 2 \text{ mM}$ の範囲がより好ましい。有機酸の使用量が多い場合はかえってアパタイトの形成を阻害する結果となりやすく、使用量が少ない場合はアパタイトの形成を促進する効果が低い。

【0009】コラーゲン膜を浸漬する水溶液にはアパタイトを形成するためのリン酸イオンとカルシウムイオンが含まれている必要がある。ここでリン酸イオンとしては、 PO_4^{3-} 、 HPO_4^{2-} および H_2PO_4^- のいずれであってもよい。水溶液中のリン酸イオンの濃度としては $0.3 \sim 5 \text{ mM}$ の範囲が好ましく、 $1 \sim 2 \text{ mM}$ の範囲がより好ましい。水溶液中のカルシウムイオンの濃度としては $0.5 \sim 10 \text{ mM}$ の範囲が好ましく、 $2.5 \sim 5 \text{ mM}$ の範囲がより好ましい。

【0010】水溶液中にはリン酸イオンとカルシウムイオンの他に各種イオンを含むことができ、特に生体内の体液や血液に含まれる、 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 等の陽イオンや、 OH^- 、 Cl^- 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 等の陰イオンを適量含む水溶液が好ましい。このような各種イオンを含む水溶液としては、いわゆる SBF (Simulated Body Fluid: 擬似体液) を使用することもできる。

【0011】また、水溶液の pH は $5 \sim 10$ の範囲とすることが望ましく、pH $6 \sim 8$ がより好ましい。そのため有機緩衝剤を含むことができる。例えば、トリスヒドロキシルアミノメタン等を使用することができる。pH が 5 未満では第二リン酸カルシウム塩が析出しやすくなり、pH が 10 より大きい場合には水酸化カルシウムが安定相となりアパタイトが析出しにくくなる。

【0012】本発明で基板として用いられる親水基を有する有機材料としては特に限定されないが、少なくともコラーゲンおよび/またはセルロースを含むものが好ましく用いられる。この場合、有機材料の 50 重量%以上、好ましくは 70 重量%以上がコラーゲンおよび/またはセルロースで構成されていることが好ましい。また、基板として水溶性の基板 (例えば水溶性タンパク質等) を用いるときは架橋反応等で不溶化してから用いることが望ましい。

【0013】本発明で用いられる親水基を有する有機材料の形状としては、特に限定されず、膜状、繊維状等の形状が挙げられる。上記水溶液に親水基を有する有機材料を浸漬し、好ましくは温度 $20 \sim 45^\circ\text{C}$ で 1 日以上保持することで、有機材料表面にアパタイト層が析出する。通常粒径が $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ 程度の大きさの微粒子状のアパタイトが析出するので、アパタイト層の厚層は 1

$\sim 10 \mu\text{m}$ 程度となる。析出したアパタイト層には、用いた水溶液中に含まれる他の陽イオン、陰イオンに由来する成分が含まれることがある。例えば炭酸水素イオンを含む水溶液を用いると、炭酸イオンを含むアパタイト層が析出する場合がある。

【0014】本発明において有機材料としてコラーゲンをを用いた場合に得られるアパタイトコーティングコラーゲン材料は、骨誘導能または骨伝導能を有するので、生体骨吸収置換型再建材として利用できる他、骨粗鬆症や骨欠損の吸収性補填材としても利用できる。また、プリオン (低分子量タンパクに起因するヤコブ病) 等の疾病対策として頭蓋骨硬膜に用いられる人工硬膜としても利用できる。さらには、アミノ酸・糖質・サイトカインを含有する組織工学に用いられる生理活性性基材や抗癌剤等の生体融和型薬剤徐放性基材としても利用できる。これらにおいて、コラーゲンの形状を膜状とすることで薄く広く覆うことができるという効果が発揮される。具体的には、組織再生誘導法により大型骨欠損を覆うことにより骨再建をすることができる。

【0015】本発明において有機材料としてセルロースを用いた場合に得られるアパタイトコーティングセルロース材料はアパタイトのウイルスや細菌吸着能を利用して空気清浄用フィルター、機能性マスクに応用できる。またアパタイトのタンパク質や核酸吸着能を利用して生理活性物質の同定または分離用カラム等に応用できる。

【0016】

【実施例】以下に実施例によりさらに詳細に本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

<実施例 1、比較例 1> アパタイト形成能を持たないコラーゲン膜 (新田ゼラチン (株) 製、コラーゲン 80 重量%、セルロース 20 重量%、膜厚 $40 \mu\text{m}$ 、大きさ $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) を、 Ca^{2+} : 3.8 mM 、 HPO_4^{2-} : 1.5 mM 、 Na^+ : 213 mM 、 K^+ : 7.5 mM 、 Mg^{2+} : 2.3 mM 、 Cl^- : 223 mM 、 HCO_3^- : 6.3 mM 、 SO_4^{2-} : 0.75 mM 、および緩衝剤としてトリスヒドロキシルアミノメタンを pH 7.4 にするのに必要な量、核形成促進剤としてのクエン酸をそれぞれ 0.3 mM 、 0.5 mM 、 0.7 mM 、 1 mM 、 2 mM 、 3 mM を含有する水溶液に浸漬し、 36.5°C で 1 週間保持した。その後コラーゲン膜を取り出し、赤外分光、X 線回折、発光分光で分析したところ、いずれも表面に炭酸イオンを含むアパタイトのコーティング膜が $3 \mu\text{m}$ の厚さで均一に生成していることが確認された。<比較例 1> 上記実施例 1 において、水溶液中にクエン酸を含まないこと以外は全く実施例 1 と同様にして、コラーゲン膜を水溶液に浸漬したが、4 週間以上経過しても膜表面には何も析出しなかった。

【実施例 1 および比較例 1 で得られたコラーゲン膜の分析結果】 実施例 1 においてクエン酸を 1 mM 含む水溶液を用いて得られたコラーゲン膜の表面の電子顕微鏡写真

を図1および図2に示す。図1は倍率1000倍、図2は倍率9000倍で観察したものである。図1からコラーゲン線維に沿ってアパタイトが析出していることがわかる。図2から析出したアパタイトは粒径0.7 μ m程度の微粒子状であることがわかる。

【0017】比較例1で得られたコラーゲン膜の表面の電子顕微鏡写真(倍率1000倍)を図3に示す。コラーゲン膜表面には何も析出していないことがわかる。図4に、実施例1および比較例1で得られたコラーゲン膜の赤外分光のスペクトルを示す。C0.3、C0.5、C0.7、C1.0、C2.0、C3.0はそれぞれ、実施例1におけるクエン酸の濃度が0.3mM、0.5mM、0.7mM、1mM、2mM、3mMのコラーゲン膜のスペクトルであり、C0が比較例1のコラーゲン膜のスペクトルである。実施例1のスペクトルでは、いずれも1020 cm^{-1} と954 cm^{-1} の(PO_4)³⁻イオンのピークと、876 cm^{-1} の(CO_3)²⁻イオンのピークが見られ、比較例1のスペクトルではこれらは見られないことから、実施例1ではアパタイトが析出していることがわかる。

【0018】図5に、実施例1においてクエン酸を1mM含む水溶液を用いて得られたコラーゲン膜のスペクトル(上側)と、比較例1で得られたコラーゲン膜のX線回折のスペクトル(下側)を示す。上側のスペクトル中のAという印のところがアパタイトの結晶構造に由来するピークであり、実施例1ではアパタイトが析出していることがわかる。

＜実施例2＞基板としてセルロース製ガーゼを用い、クエン酸濃度1mMの水溶液を用いた他は実施例1と同様の条件で行ったところ、表面に炭酸イオンを含むアパタイトのコーティング膜が3 μ mの厚さで均一に生成していることが確認された。

【0019】コーティング膜の表面を倍率2000倍で観察した電子顕微鏡写真を図6に示す。図6からセルロース線維に沿ってアパタイトが析出していることがわかる。

【0020】比較例2で得られたセルロース製ガーゼの表面の電子顕微鏡写真(倍率2000倍)を図7に示す。セルロース製ガーゼ表面には何も析出していないことがわかる。

【0021】

【発明の効果】本発明によると、親水基を有する有機材料の表面に穏和な条件下での処理によりアパタイト層を形成することができるので、アパタイト形成能を有しないコラーゲンやセルロース等の表面にもアパタイト層を形成することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1においてクエン酸を1mM含む水溶液を用いて得られたコラーゲン膜の表面の電子顕微鏡写真である(倍率1000倍)。

【図2】 実施例1においてクエン酸を1mM含む水溶液を用いて得られたコラーゲン膜の表面の電子顕微鏡写真である(倍率9000倍)。

【図3】 比較例1で得られたコラーゲン膜の表面の電子顕微鏡写真である(倍率1000倍)。

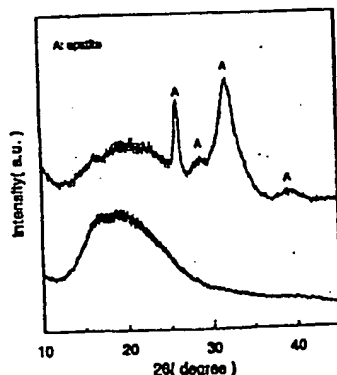
【図4】 実施例1および比較例1で得られたコラーゲン膜の赤外分光のスペクトルである。

【図5】 実施例1においてクエン酸を1mM含む水溶液を用いて得られたコラーゲン膜と比較例1で得られたコラーゲン膜のX線回折のスペクトルである。

【図6】 実施例2で得られたコーティング膜の電子顕微鏡写真である(倍率2000倍)。

【図7】 比較例2で得られたセルロース製ガーゼの表面の電子顕微鏡写真である(倍率2000倍)。

【図5】

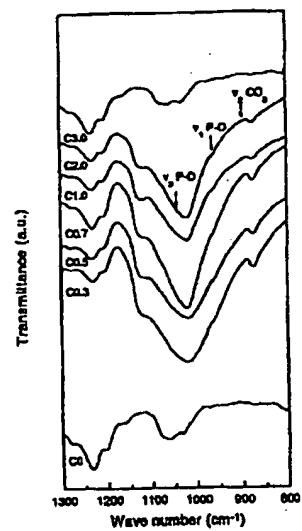


【图1】

图面代用写真



【图4】



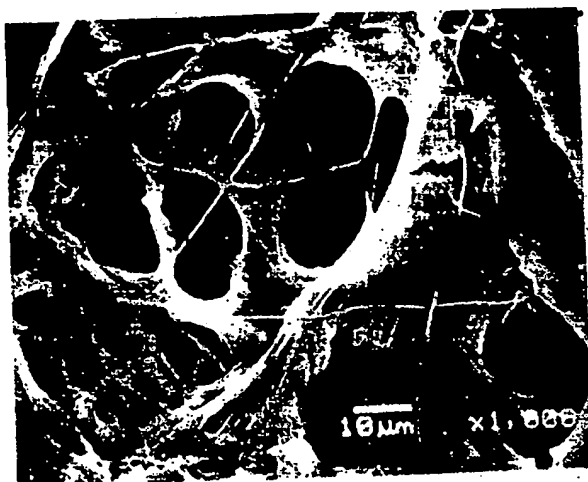
【图2】

图面代用写真



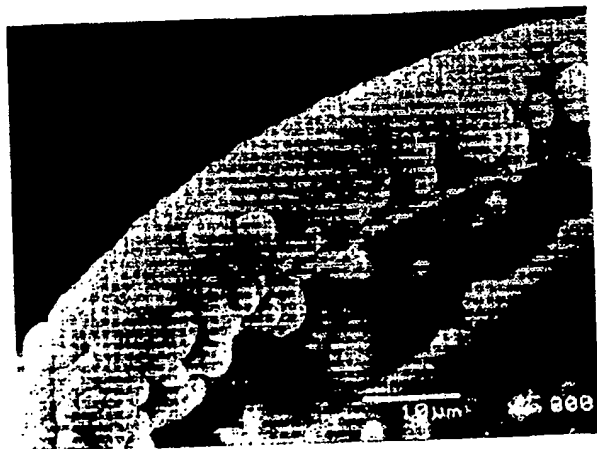
【图3】

图面代用写真



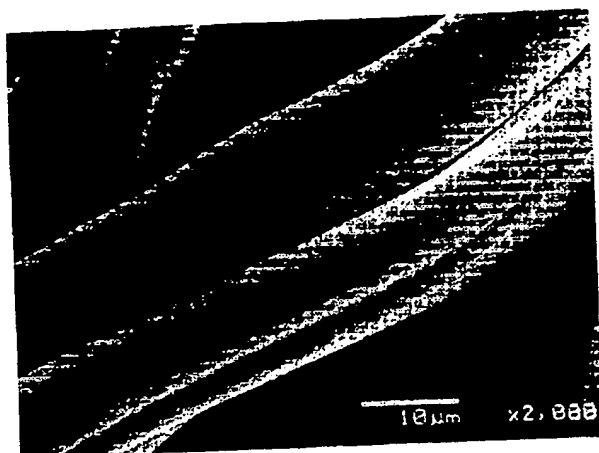
【图6】

图面代用写真



【図7】

図面代用写真



フロントページの続き

(72)発明者 佐藤 公泰

茨城県つくば市二の宮3-7-6 サンラ
イフ大山B-102

(72)発明者 菊地 正紀

茨城県つくば市梅園2-27-7 パームハ
イツ梅園

(72)発明者 森村 正博

大阪府八尾市二俣2丁目22番地 新田ゼラ
チン株式会社大阪工場内

(72)発明者 中谷 伸一

大阪府八尾市二俣2丁目22番地 新田ゼラ
チン株式会社大阪工場内

(72)発明者 萬代 佳宣

大阪府八尾市二俣2丁目22番地 新田ゼラ
チン株式会社大阪工場内

Fターム(参考) 4C081 AA02 AB04 AB18 AC03 AC05

AC15 BA13 BA16 BB06 CD021

CD121 CE02 CE11 CF011

CF032 DA02 DA04 DC03

DC05 DC06 DC14 EA02 EA05

EA06 EA12